

“ESTABILIZACIÓN DEL CATECOL COMO SUSTRATO PARA LA SÍNTESIS DE L-3,4-DIHIIDROXIFENILALANINA (L-DOPA) POR CÉLULAS DE *C. freundii* CON ACTIVIDAD TIROSINFENOLIASA”

Gerardo J. Sosa Santillán*, César J. González Ortiz, Yolanda Garza García y Jesús Rodríguez Martínez
Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila.
Blvd. V. Carranza y José Cárdenas V., Col. República Ote. C.P. 25280, Tel. (8) 415-57, 52, Fax (8) 415-95-34,
Saltillo, Coahuila. Email: gdejsosa@yahoo.com

Palabras clave: *L-DOPA*, *Tirsonfenoliasa*, *C. freundii*.

Introducción. La tirosinofenolasa (TFL) es una de las enzimas con mas amplio potencial para la producción de los aminoácidos L-tirosina y L-3,4-dihrofenilalanina (L-DOPA)². La TFL es una enzima ampliamente distribuida entre los organismos procariotas como *Erwinia herbicola* y *Citrobacter freundii*.⁴ La L-DOPA es importante por su empleo en el tratamiento del mal del Parkinson⁴. Uno de los problemas que se presentan durante la síntesis de este aminoácido mediante la acción catalítica de la TFL, es la rápida oxidación del catecol, uno de los sustratos utilizados³. Debido a ello, este trabajo se centró en el estudio de la adición de ácido bórico a la mezcla reaccionante para la síntesis de L-DOPA, como estabilizador del catecol.

Metodología Para este estudio se utilizó como biocatalizador células libres de *C. freundii* con actividad TFL. Estas células fueron propagadas mediante incubación en matraces erlenmeyer a 32°C durante 12 horas, posteriormente las células fueron separadas por centrifugación y el paquete celular obtenido fue suspendido en buffer de fosfatos. Las células fueron colocadas en reactores batch que contenían 30 mL de mezcla reaccionante para síntesis de L-DOPA (catecol, piruvato y amonio), a un pH de 7.5 y una temperatura de 30°C. Se probaron, añadiendo a la mezcla reaccionante, las siguientes concentraciones de ácido bórico: 0, 30, 60, 120 y 240 mM. La reacción fue monitoreada siguiendo la formación de producto.

Resultados y Discusión. La figura 1 muestra las cinéticas de formación de producto en la reacción de síntesis de L-DOPA catalizada por células de *C. freundii* con actividad TFL.

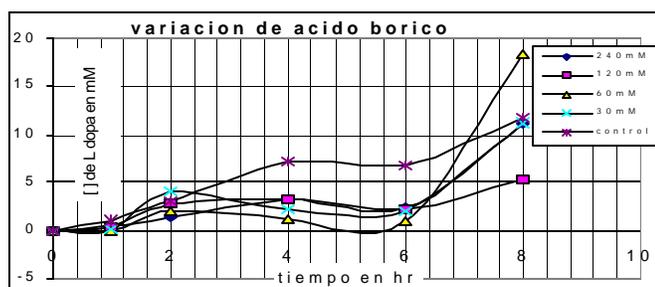


Figura 1. Cinética de formación de L-DOPA

Se observa que los mejores resultados en cuanto a regularidad de la reacción se obtienen en el control (sin ácido bórico); no obstante, la máxima producción se observa al utilizar una

concentración de ácido bórico de 60 mM, siendo interesante que la producción es prácticamente nula hasta las seis horas, disparándose repentinamente desde este tiempo y hasta las 8 horas. Este comportamiento también se da, aunque en menor proporción, a las concentraciones de 30, 120 y 240 mM de ácido bórico. Esto parece indicar que la formación de un complejo catecol-borato retrasa la reacción por afectarse el acoplamiento del sustrato al sitio activo de la enzima. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Foor et al.¹, quienes utilizaron una concentración de 240 mM de ácido bórico obteniendo buenos resultados.

Conclusiones. Los resultados obtenidos en este trabajo refuerzan la idea de que es necesario estudios más detallados sobre la estabilización del catecol para su uso como sustrato para la síntesis de L-DOPA. Pareciera ser que el ácido bórico no es una opción adecuada para este propósito, por lo que se hace necesario implementar nuevos estudios para probar otros tipos de antioxidantes que mejoren la reacción TFL en este proceso.

Agradecimientos. Este proyecto es financiado por el Departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A. de C.

Bibliografía

1. Foor, F., N. Morin and K.A. Bostian. 1993. Production of L-dihydroxyphenylalanine in *Escherichia coli* with the tyrosine phenol-lyase gen cloned from *Erwinia herbicola*. Appl. Environ. Microbiol. 59(9):3070-3075.
2. Harrison, L. 1987. Inmovilized enzymes and their applications. In: Biotecnology of waste treatment and exploitation. Sidwick, J. and R. Holdhom, eds. England p.p. 81-120.
3. Hee-Sung Park, Jang-Young Lee, Hak-Sung Kim. 1998. Production of L-DOPA (3,4-dihydroxyphenyl-alanine) from Benzene by Using a hybrid pathway. Biotechnology and Bioengineering. 58(2-3):339-343.
1. Para, G. and J. Baratti. 1988. Synthesis of L-DOPA by *Escherichia intermedia* cells immobilized in a polyacrylamide gel. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28:222-228.